

PENGARUH KONSENTRASI GLUTARALDEHID PADA KOMPOSISI MEMBRAN ELEKTRODA BIOSENSOR PESTISIDA KARBAMAT

Mashuni^{1*}, M. Syahrul², A. Ahmad², A. W. Wahab²

¹Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Haluoleo Kendari, Sulawesi Tenggara 93231

²Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Hasanuddin Makassar, Sulawesi Selatan 90245

Abstrak. Penggunaan pestisida karbamat pada beberapa tahun terakhir perkembangannya meluas disebabkan karena kestabilannya yang rendah di lingkungan tetapi mempunyai tingkat toksisitasnya yang tinggi. Keberadaan pestisida di lingkungan dan bahan pangan dapat berpotensi menimbulkan bahaya bagi kesehatan manusia oleh karena itu dibutuhkan metode deteksi yang cepat dan akurat untuk memonitor keberadaan pestisida tersebut. Tujuan penelitian ini adalah mendesain biosensor untuk analisis residu pestisida karbamat pada bahan pangan dengan melihat pengaruh konsentrasi glutaraldehid (GA) pada komposisi membran elektroda biosensor. Enzim asetilkolinesterase (AChE) dan kolin oksidase (ChO) diimmobilisasikan pada kawat platina (Pt) yang dilapisi dengan bahan membran selulosa asetat 10% dan GA 15%, 20% dan 25%. Hasil penelitian ini memperlihatkan pada GA 15% limit deteksi yang diperoleh adalah $10^{-7.8}$ M, pada GA 20% limit deteksi yang diperoleh adalah $10^{-8.4}$ M, dan untuk GA 25% limit deteksi yang diperoleh adalah $10^{-8.7}$ M. Hasil ini sama dengan 0,0022 ppm atau 2,2 ppb – 0,0002 ppm atau 0,2 ppb. Dari analisis biosensor diperoleh hasil yang sensitif pada penentuan residu pestisida karbamat. Hasil ini sesuai dengan analisis menggunakan metode konvensional yaitu kromatografi gas (GC) dan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) masing-masing yaitu 1,5 ppb dan 2,0 ppb. Analisis pestisida dengan biosensor ini diharapkan menghasilkan metode yang lebih sensitif, akurat, biaya yang rendah dan prosedur yang sederhana.

Kata kunci: Biosensor, glutaraldehid, selulosa asetat, immobilisasi, pestisida karbamat

Abstract. In recent years carbamic pesticides, which show low environmental persistence but a high acute toxicity. Their presence in environmental and food poses a potential hazard to human health and there is a growing interest in their rapid and accurate determination for food safety and environmental monitoring. The aim of this research is to design biosensor for analyzing carbamate pesticides residue in sample show with composite variable concentrate glutaraldehyde (GA) in electrode membrane. Enzim acetylcholinesterase (AChE) was co-immobilised with choline oxidase (ChO) onto a platinum (Pt) surface using a solution of 10% cellulose acetate and 15%, 20%, 25% glutaraldehyde. Result of this research show that glutaraldehyde 15% the detection limit is $10^{-7.8}$ M for glutaraldehyde 20% the detection limit is $10^{-8.4}$ M and glutaraldehyde 25% the detection limit is $10^{-8.7}$ M. This a results is approximately equal to 0,0022 ppm or 2,2 ppb – 0,0002 ppm or 0,2 ppb, which means that this biosensor is sensitive for determining carbamates pesticides residue where its detection limit is comparable to to the detection limit of conventional instrument such as Gas Chromatography (GC) and High Pressure Liquid Chromatography (HPLC), i.e. respectively 1,5 ppb and 2,0 ppb. The proposed electrochemical pesticide sensitivity test exhibited high sensitivity, desirable accuracy, low cost and simplified procedure.

Keywords: Biosensors, glutaraldehyde, cellulose acetate, immobilised, carbamate pesticides

*Alamat korespondensi: mashuni2696@yahoo.com

PENDAHULUAN

Dalam beberapa dekade terakhir pemakaian pestisida didominasi oleh dua jenis insektisida yaitu senyawa karbamat dan organofosfat. Kedua senyawa tersebut banyak diaplikasikan pada pengolahan pertanian karena kestabilannya yang rendah di lingkungan dibandingkan dengan senyawa organoklorin (Pogacnik dan Franko, 2003; Skadal, et al., 1997]. Efisiensi karbamat dan organofosfat sebagai pestisida dan toksisitasnya terhadap manusia dan hewan disebabkan oleh kemampuan menghambat kelompok enzim hidrolase yang disebut esterase. Enzim asetilkolinesterase (AChE) sangat penting untuk sistem saraf pusat pada manusia dan serangga (Prieto-Simon et al., 2006).

Enzim asetilkolinesterase menghidrolisis asetilkolin pada membran untuk mencegah akumulasi. Penghambatan AChE menyebabkan akumulasi asetilkolin sehingga terjadi disfungsi beberapa sistem saraf dan perilaku dan dapat memicu kerusakan pada sistem pernafasan serta akhirnya dapat menyebabkan kematian (Donarski et al., 1989; Tuovinen et al., 1994].

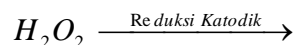
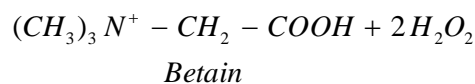
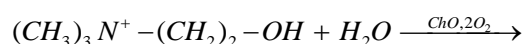
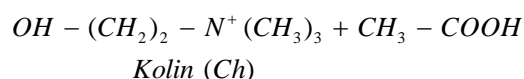
Beberapa organisasi internasional mengatur batas maksimum residu pestisida pada konsumsi air minum dan pangan bagi manusia dan hewan. Beberapa diantaranya adalah *the Food and Agricultural Organisation (FAO)*, *the World Health Organisation (WHO)*, *the European Community (EU)*. Salah satu kebijakan yang dikeluarkan adalah memonitor batas satu jenis pestisida yang diperbolehkan pada suatu produk

Inhibisi AChE sesuai dengan konsentrasi pestisida, diukur sebagai suatu pengurangan kecepatan pembentukan H_2O_2 sesuai dengan pengurangan arus katodik yang dihasilkan oleh biosensor (Skadal, et al., 1997).

adalah 0,1 $\mu\text{g/L}$ dan konsentrasi total pestisida tidak boleh melebihi 0,5 $\mu\text{g/L}$ (Prieto-Simon et al., 2006).

Analisis pestisida yang sudah sering dilakukan adalah dengan kromatografi gas (GC) atau kromatografi cair tekanan tinggi (HPLC). Kelemahan metode analisis ini karena membutuhkan perlakuan ekstraksi dan pemurnian di laboratorium yang membutuhkan waktu analisis yang lebih lama dan memungkinkan terdapatnya resiko kesalahan. Untuk mengatasi kekurangan tersebut sekarang ini sedang dikembangkan analisis pestisida dengan biosensor. Keunggulan dari analisis pestisida dengan biosensor adalah respon yang cepat, selektif, sederhana dan biayanya yang relatif murah (Mehrvar dan Abdi, 2004, Velasco-Garcia dan Mottram, 2003).

Pengembangan biosensor yang lebih sensitif dapat dilakukan dengan menggunakan sistem sensor bienzimatik untuk mendeteksi pestisida. Enzim yang dapat digabungkan secara bersama untuk mendeteksi pestisida adalah asetilkolinesterase (AChE) dan kolin oksidase (ChO), persamaan reaksinya dapat dilihat sebagai berikut:



350 mV vs Ag / AgCl

Biosensor memiliki sensitivitas dan selektivitas yang tinggi, kecepatan respon, biaya yang rendah serta pengoperasiannya yang mudah, maka biosensor menjadi suatu peralatan penting untuk mendeteksi komponen kimia dan biologi pada obat-obatan, makanan dan monitoring lingkungan (Amine et al.,

2006; Baemner, 2004; Renedo et al., 2007; Tudorache dan Bala, 2007).

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah menghasilkan biosensor karbamat yang sensitif untuk menganalisis kandungan residu pestisida yang terdapat pada bahan pangan terutama residu yang terkandung pada sayur-sayuran. Dalam penelitian ini akan didisain biosensor karbamat menggunakan membran enzim Asetilkolinesterase (AChE) dan kolin oksidase (ChO) dengan bahan pendukung Selulosa Asetat (SA) dan Glutaraldehyd (GA) dalam bentuk elektroda kawat terlapis. Selulosa asetat memiliki kestabilan yang baik terhadap berbagai macam zat kimia, mempunyai kekuatan mekanik yang baik dan tahan terhadap tekanan tinggi sehingga dapat menahan materi yang sangat kecil. Penggunaan glutaraldehyd dilakukan karena sifatnya sebagai ikatan pembawa berfungsi sebagai pereaksi bifungsional antara enzim dan selulosa asetat. Penggunaan komposisi membran dan konstruksi elektroda tersebut untuk deteksi karbamat belum pernah dipublikasikan.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan adalah kawat perak, KCl, kawat tembaga, kawat platina, kawat timah, enzim asetilkolinesterase (AChE), enzim kolin oksidase (ChO_x), Selulosa Asetat (SA), Glutaraldehyd (GA), asetilkolin klorida, pestisida karbamat (karbofuran), NaH₂PO₄.H₂O, Na₂HPO₄.12H₂O, aseton, etanol, aquades, parafilm.

Alat

Alat yang digunakan adalah pH meter Orion Model 710A/potensiometer, pengaduk magnetik, oven, neraca analitik, stopwatch, solder, lemari pendingin, tip biru, peralatan gelas yang biasa digunakan di laboratorium.

Prosedur

Pembuatan larutan standar

Penyiapan larutan NaH₂PO₄. H₂O 0,2 M (larutan A) dan larutan Na₂HPO₄. 12H₂O 0,2 M (larutan B). Selanjutnya dari larutan A dan larutan B dibuat masing-masing larutan buffer fosfat pH 8,0. Larutan standar substrat asetilkolin klorida dibuat dalam pelarut buffer fosfat pH 8,0 pada konsentrasi 1×10^{-3} M - 1×10^{-9} M. Selanjutnya larutan standar pestisida karbofuran 1×10^{-1} M disiapkan dengan menimbang secara teliti karbofuran kemudian dilarutkan dengan etanol dalam labu ukur 100 ml diencerkan sampai tanda batas. Terhadap larutan ini kemudian dilakukan pengenceran sampai konsentrasi 1×10^{-2} M - 1×10^{-9} M. Penyiapan larutan KCl 0,1 M, dilakukan dengan melarutkan 0,7445 gram KCl ke dalam aquades pada labu ukur 100 ml selanjutnya diencerkan dengan aquades hingga tanda batas.

Pembuatan larutan enzim AChE dan ChO_x

Enzim AChE dari Electrophorus electricus Sigma 1,17 mg dengan aktivitas 425,94 unit per mg padatan dilarutkan dalam pelarut 9,0 ml buffer fosfat pH 8,0 dan 1 ml KCl 0,1 M. Enzim ChO_x dari Alcaligenes sp lyophilized Sigma sebanyak 3,3 mg dengan aktivitas 15 unit per mg padatan dilarutkan dalam pelarut 9,0 ml buffer fosfat pH 8,0 dan 1 ml KCl 0,1 M.

Pembuatan selulosa asetat 10%, dan glutaraldehyd 15%, 20% 25%

Selulosa Asetat (SA) 10% dibuat dengan menimbang masing-masing 1,0 gram SA. Selanjutnya SA dilarutkan dengan aseton 10 ml. Larutan Glutaraldehyd (GA) 25% yang digunakan pada penelitian ini adalah produksi Aldrich Sigma dari larutan ini dibuat pengenceran sehingga didapatkan GA 15% dan 20%.

Pembuatan membran Biosensor

Membran dibuat dari enzim asetilkolinesterase (AChE) dan kolin oksidase (ChO_x) yang diimmobilisasikan pada bahan pendukung selulosa asetat (SA) dan glutaraldehid (GA) dengan komposisi seperti pada Tabel 1.

Tabel 1 Komposisi biosensor pestisida karbamat

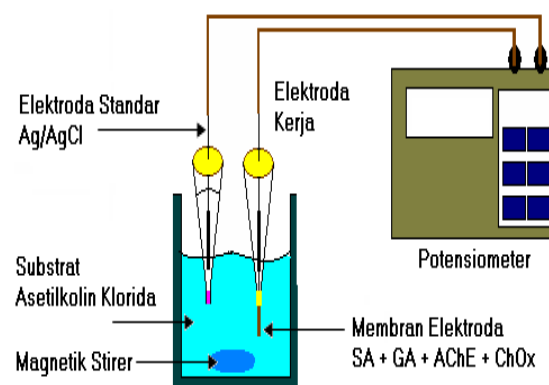
Komposisi Membran			
Selulosa Asetat (SA)	Glutaraldehid (GA)	AChE (IU/ml)	ChO (IU/ml)
10 %	15 %	49,830 3	4,95
	20 %		
	25 %		

Desain elektroda biosensor tipe kawat terlapis

Badan elektroda dibuat dari kawat tembaga panjang 7 cm dengan diameter 1 cm disambungkan dengan kawat platina (Pt) panjang 2,0 cm berdiameter 0,4 mm kemudian dipatri menggunakan kawat timah. Selanjutnya dimasukkan ke dalam tip biru dengan posisi kawat platina (Pt) menonjol keluar 1,5 cm digunakan sebagai badan elektroda. Pada masing-masing badan elektroda dililitkan plastik parafilm sebagai perekat kawat Cu dan kawat Pt. Bagian ujung elektroda yaitu kawat Pt dicelupkan dalam larutan homogen selulosa asetat. Setelah lapisan selulosa asetat terbentuk, elektroda dibilas dengan aquades sebanyak tiga kali. Selanjutnya pada bagian kawat Pt yang telah dilapisi membran selulosa asetat dicelupkan dalam larutan glutaraldehid selama enam jam setelah itu elektroda dibilas buffer fosfat pH 8,0 maka terbentuk elektroda membran (Em), selanjutnya Em dicelupkan dalam buffer fosfat pH 8,0 yang mengandung enzim asetilkolinesterase dan enzim kolin oksidase selama 48 jam. Elektroda membran (Em) yang belum digunakan tetap dicelupkan ke dalam buffer fosfat pH 8,0 pada temperatur 4 °C.

Pengukuran Batas Deteksi Biosensor Pestisida Karbamat

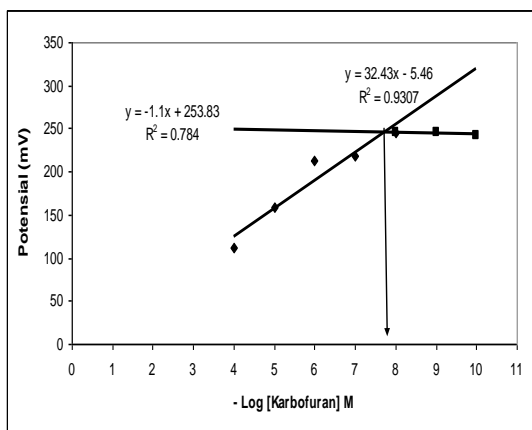
Pengukuran potensial substrat Asetilkolin klorida dengan inhibitor pestisida karbofuran dengan cara elektroda biosensor yang telah dibuat sebelum dipakai terlebih dahulu dicelupkan dalam larutan buffer fosfat pH 8,0 kemudian elektroda biosensor digunakan untuk mengukur potensial substrat asetilkolin klorida dengan konsentrasi 10^{-3} M yang telah ditambahkan larutan karbofuran dengan konsentrasi bervariasi dari 10^{-3} – 10^{-9} M. Pengukuran respon biosensor seperti Gambar 1.



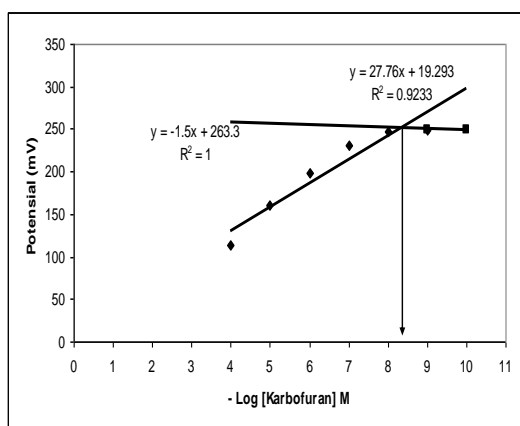
Gambar 1. Desain pengukuran respon biosensor

HASIL DAN PEMBAHASAN

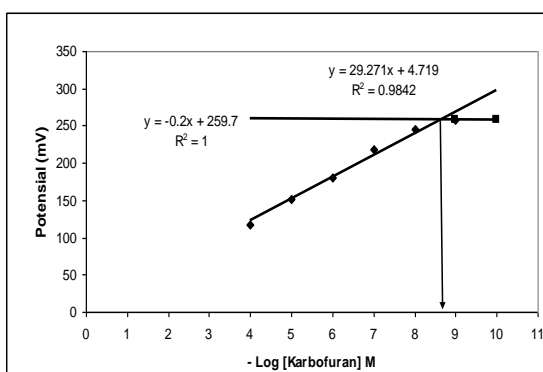
Metode analisis yang spesifik bagi penentuan kuantitatif suatu unsur atau molekul dalam jumlah renik pada suatu sampel selalu dihadapkan pada limit deteksi yang dinyatakan dengan suatu konsentrasi terendah dari suatu zat yang dapat ditentukan. Penentuan limit deteksi suatu elektroda dapat dilakukan dengan membuat garis singgung pada fungsi linier yang Nernstian dan non Nernstian. Titik potong kedua garis diekstrapolasikan ke sumbu x sehingga dapat diperoleh konsentrasi limit deteksi. Hasil penentuan limit deteksi elektroda biosensor yang telah didisain dapat dilihat pada Gambar 2 sampai gambar 4.



Gambar 2. Limit deteksi biosensor untuk komposisi membran SA 10%, GA 15% pada konsentrasi substrat 10^{-3} M (A)



Gambar 3. Limit deteksi biosensor untuk komposisi membran SA 10%, GA 20% pada konsentrasi substrat 10^{-3} M (B)



Gambar 4. Limit deteksi biosensor untuk komposisi membran SA 10%, GA 25% pada konsentrasi substrat 10^{-3} M (C)

Dari hasil ekstrapolasi terhadap sumbu x yaitu $-\log [\text{karbofuran}]$ diperoleh limit deteksi biosensor dengan komposisi membran SA 10%, GA 15% adalah $10^{-7.8}$ M ($\approx 0,00221$ ppm atau 2,2 ppb). Limit deteksi biosensor dengan komposisi membran SA 10%, GA 20% adalah $10^{-8.4}$ M ($\approx 0,00221$ ppm). Limit deteksi biosensor dengan komposisi membran SA 10%, GA 25% adalah $10^{-8.7}$ M ($\approx 0,0002$ ppm atau 0,2 ppb). Limit deteksi biosensor dengan komposisi membran 10%, GA 25% ini yang terbaik dari biosensor lainnya. Pada Gambar 2 – 4 hasil ekstrapolasi terhadap sumbu x yaitu $-\log [\text{karbofuran}]$ diperoleh limit deteksi biosensor $10^{-7.8}$ - $10^{-8.7}$ M ($\approx 2,2$ - 0,2 ppb). Immobilisasi enzim AChE dan ChO pada bahan pendukung selulosa asetat dan glutaraldehid dapat dilakukan dalam pembuatan membran biosensor pestisida karbamat. Membran selulosa asetat memiliki kestabilan yang baik terhadap berbagai macam zat kimia, mempunyai kekuatan mekanik yang baik sehingga tahan terhadap tekanan tinggi dan selektif sehingga dapat menahan materi yang sangat kecil. Biosensor yang didasarkan pada prinsip inhibisi enzim dapat digunakan secara luas untuk mendeteksi suatu analit seperti komponen pestisida dan logam berat. Pemilihan sistem enzim/analit didasarkan pada kenyataan bahwa analit toksik ini menghambat fungsi normal enzim. Pada umumnya, pengembangan sistem biosensing ini mengandalkan pengukuran kuantitatif pada aktivitas enzim sebelum dan sesudah direaksikan atau dikontakkan dengan suatu analit target. Limit deteksi secara lengkap untuk masing masing komposisi membran biosensor dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil kinerja biosensor karbamat

Tipe Membran	Komposisi Membran		Kinerja Biosensor
	SA	GA	Limit Deteksi (LD)
A	10 %	15 %	$10^{-7,8}$ M
B		20 %	$10^{-8,4}$ M
C		25 %	$10^{-8,7}$ M

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa untuk komposisi membran SA 5% dan GA 25% diperoleh limit deteksi $10^{-7,7}$ M, untuk SA 10% dan GA 25% diperoleh limit deteksi $10^{-8,7}$ M, untuk SA 15% dan GA 25% diperoleh limit deteksi $10^{-7,6}$ M. Hasil tersebut sebanding dengan 0,0022 ppm atau 2,2 ppb). Kemampuan unjuk kerja biosensor meliputi spesifisitas yang tinggi dan sensitivitas, kecepatan respon, biaya yang relatif murah, peralatan yang relatif kompak, dan pengoperasian peralatan yang mudah dan aman, maka biosensor menjadi suatu peralatan yang penting untuk mendeteksi komponen biologi dan kimia pada bidang kesehatan, pangan dan monitoring lingkungan. Sementara itu gabungan transduser elektrokimia dengan suatu enzim sebagai komponen biologi menyebabkan penggunaannya menjadi luas.

Limit deteksi biosensor karbamat berkisar antara 10^{-7} – 10^{-9} M. Limit deteksi maksimum diperoleh pada komposisi membran selulosa asetat (SA) 10% dan glutaraldehid (GA) 25%. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa biosensor berbasis enzim asetilkolinesterase dan kolin oksidase dapat digunakan untuk mendeteksi pestisida karbamat sampai pada limit deteksi 10^{-9} M setara dengan 0,2 ppb. Sebagaimana alat ukur instrumen lain seperti GC dan HPLC yang mempunyai limit deteksi karbamat masing-masing sebesar 1,5 ppb dan 2,2 ppb, maka biosensor hasil desain dapat diaplikasikan untuk mendeteksi pestisida karbamat

dengan lebih efisien karena dapat dibawa ke lapangan.

DAFTAR PUSAKA

1. Amine, A., Mohammadi, H., Bourais, I. and Palleschi, G., 2006, Enzyme Inhibition-Based Biosensors for Food Safety and Environmental Monitoring, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1405 – 1423.
2. Baeumner, A., 2004, Biosensor for Environmental Pollutants and Food Contaminants, *Anal Bioanal Chem*, 377, 434 – 445
3. Ciucu, A.A., Negulescu, C., and Baldwin, R.P., 2003, Detection of Pesticides Using an Amperometric Biosensors Based on Ferrophthalocyanine Chemically Modified Carbon Paste Electrode and Immobilized Biotinylated System, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 303 – 310.
4. Donarski, W.J., Dumas, D.P., Heitmeyer, D.P., Lewis, V.E., and Raushel, F.M., 1989, Structure-activity Relationship in The Hydrolysis of Substrates by The Phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*, *Biochemistry*, 28, 4650-4655.
5. Mehrvar, M. and Abdi, M., 2004, Recent Developments, Characteristics and Potential Applications of Electrochemical Biosensors, *Analytical Science*, 20, 1113 – 1126.
6. Prieto-Simon, B., Campas, M., Andreescu, S., and Marty, J., 2006, Trends in Flow-based Biosensing Systems for Pesticide Assessment, *Sensors*, 6, 1161 – 1186.
7. Pogacnik, L., and Franko, M., 2003, Detection of Organophosphate and Carbamate Pesticides in Vegetable Samples by a Photothermal Biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 109.
8. Renedo, O.D., Alonso-Limillo, M.A. and Martinez, M.J., 2007, Recent

- Developments in the Field of Screen-Printed Electrodes and their Related Applications, *Talanta*. 73, 202 – 219.
9. Skadal, P., Nunes, G.S., Yamanaka, H., and Ribeno, M.L., 1997, Detection of Carbamate Pesticides in Vegetable Samples Using Cholinesterase-based Biosensors, *Electroanalysis*, 9, 1083-1087.
 10. Tudorache, M., and Bala, C., 2007, Biosensors Based on Screen-Printing Technology, and their Applications in Environmental and Food Analysis, *Anal Bioanal Chem*, 388, 565 – 578.
 11. Tuovinen, K., Kaliste-Korhonen, E., Raushel, F.M., and Hanninen, O., 1994, Phosphotriesterase-A Promising Candidate for Use in detoxification of Organophosphates, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 23, 578-584.
 12. Velasco-Garcia, M.N. and Mottram, T., 2003, Biosensors Technology Addressing Agricultural Problems, *Automation and Emerging Technologies*, 84 (1), 1 – 12.